

# VARIABILIDAD GENÉTICA SEGÚN RAPD DE ÁRBOLES DE GUAYABO 'MEDIA CHINA' PROCEDENTES DE CUATRO PLANTACIONES Y SU RESPUESTA MORFOLÓGICA A BAJA DISPONIBILIDAD DE NUTRIMENTOS

J. L. Domínguez Álvarez<sup>1</sup>; J. P. Legaria-Solano<sup>1</sup>; R. Nieto-Ángel<sup>1</sup>;  
A. F. Barrientos- Priego<sup>1</sup>; J. Pineda-Pineda<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fitotecnía, Universidad Autónoma Chapingo, km 38.5 Carretera México-Texcoco, Chapingo, Estado de México. C. P. 56230. MÉXICO. (\*Autor responsable)

<sup>2</sup>Departamento de Suelos, Universidad Autónoma Chapingo, km 38.5 Carretera México-Texcoco, Chapingo, Estado de México. C. P. 56230. MÉXICO.

## RESUMEN

En la presente investigación se evaluó la variabilidad molecular y morfológica mediante marcadores tipo RAPD's (Polimorfismos en el ADN Amplificados al Azar), de plantas de guayabo (*Psidium guajava* L.) 'Media China' derivadas de semilla y sometidas a baja disponibilidad de Fe y Zn. Se establecieron asociaciones entre diecisiete caracteres morfológicos y 49 loci RAPD's y la respuesta de las plantas al estrés nutrimental, mediante análisis de agrupamiento empleando el NTSYS, DARwin y  $\chi^2$ . El análisis de los patrones RAPD's obtenidos de una muestra de 82 plantas indicó la existencia de variabilidad genética entre las mismas. De un total de 49 loci evaluados el 96 % fueron polimórficos, con un índice de diversidad promedio igual a 0.744. El análisis comparativo de la eficiencia de los marcadores RAPD's derivados de 82 plantas contra marcadores morfológicos obtenidos de 72 plantas para definir y diferenciar grupos de genotipos con y sin síntomas de deficiencia de Fe y Zn, indicó que los marcadores RAPD's son más eficientes para tal propósito. Los grupos de plantas sin síntomas se asociaron con la presencia de los loci RAPD's A20-4, A20-2 y A20-1, con un peso molecular de 0.85, 1.4 y 1.6 kb y una frecuencia de 86.5, 78 y 89 %, respectivamente; mientras que la característica común para las plantas con síntomas fue la presencia de una banda A03-3, de 1.3 kb y una frecuencia de 74 %. Por la asociación de tres loci y el carácter ausencia de síntomas, se infiere que este carácter es poligénico, determinado por el efecto combinado de las bandas A20-4, A20-2 Y A20-1, es necesaria esta combinación para la definición de los grupos sin síntomas por deficiencia de Fe y Zn. Al calcular la correlación, se encontró una asociación no significativa, con una  $r = 0.05743$ . Cuando el análisis se realizó integrando los dos tipos de marcadores en una sola matriz y utilizando el coeficiente  $\chi^2$ , no se encontró separación entre los grupos con y sin síntomas de deficiencia y el promedio de distancias para los RAPD's fue de 8.09, con una varianza de 3.87; mientras que para los caracteres morfológicos la distancia promedio fue de 0.15 y la varianza de 0.4. Lo anterior confirma la eficiencia mayor de los marcadores RAPD's para detectar variabilidad genética con relación a los marcadores morfológicos; también sugiere que los cambios que ocurren al nivel del genoma no siempre se corresponden con cambios en el fenotipo de la planta y es posible plantear que aun cuando la correlación detectada entre ambos tipos de marcadores es baja, es recomendable su evaluación simultánea dado que son complementarios: los marcadores RAPD's son buenos descriptores de la variabilidad a nivel del genoma, mientras que la variabilidad morfológica permite conducir mejor el proceso de selección visual del fenotipo y presenta la ventaja de una mayor accesibilidad.

**PALABRAS CALVE ADICIONALES:** *Psidium guajava* L., variabilidad fenotípica, evaluación morfológica, análisis RAPD's.

## GENETIC VARIABILITY ACCORDING TO RAPD OF GUAVA 'MEDIA CHINA' TREES FROM FOUR PLANTATIONS AND MORPHOLOGICAL RESPONSE TO LOW AVAILABILITY OF NUTRIENTS

## ABSTRACT

In this study, molecular and morphological variability of guava plants (*Psidium guajava* L.) "Media China" derived from seeds and subjected to low availability of Fe and Zn was evaluated by RAPD markers (Random Amplified Polymorphisms in the DNA). Associations among seventeen morphological characters and 49 RAPD loci and response of the plants to the nutrimental stress were established by cluster analysis using the NTSYS, DARwin and  $\chi^2$ . The analysis of RAPD patterns obtained from a sample of 82 plants

showed the existence of genetic variability. From a total of 49 loci evaluated, 96 % were polymorphous, with an average diversity rate of 0.744. The comparative analysis of the efficiency of RAPD markers derived from 82 plants versus morphological markers obtained from 72 plants to define and differentiate groups of genotypes with and without symptoms of deficiency of Fe and Zn, showed that the RAPD markers are more efficient for that purpose. The groups of plants without symptoms were associated with the presence of RAPD loci A20-4, A20-2 and A20-1, with a molecular weight of 0.85, 1.4 and 1.6 kb and a frequency of 86.5, 78 and 89 %, respectively, while the common characteristic for the plants with symptoms was the presence of a band A03-3, of 1.3 kb and a frequency of 74 %. Due to the association of more than one locus with the characteristic absence of symptoms, it can be inferred that this characteristic is polygenic and the combination of the three mentioned loci is necessary to define the groups without symptoms of Fe and Zn deficiency. When calculating the correlation, a non-significant association,  $r = 0.05743$ , was found. When the analysis was performed integrating the two types of markers in one single matrix and using the coefficient  $\chi^2$ , no separation between the groups with and without symptoms of deficiency was found, and the average distance for RAPD was 8.09, with a range of 3.8, while for morphological traits the average distance was 0.15 and the range was 0.4. This confirms that efficiency of RAPD markers to detect genetic variability is greater than morphological markers. It also suggests that changes that occur at genome level are not always related to changes in the plant phenotype, and it is possible to establish that even when the correlation detected between the two types of markers is low, simultaneous evaluation is advisable because they are complementary: RAPD markers are good describers of the variability at genome level, while morphological variability permits a better explanation of the selection process of the material and has the advantage of better accessibility.

**ADDITIONAL KEY WORDS:** *Psidium guajava* L., phenotype variability, evaluate morphological, RAPD analysis.

## INTRODUCCIÓN

El guayabo (*Psidium guajava* L.) probablemente tiene su origen en el trópico americano (Bourke, 1975), de donde se distribuyó a todas las zonas tropicales y subtropicales del mundo (Pennington y Sarukan, 1968). Las más de 140 especies del género *Psidium* presentes, principalmente en América parecen confirmar esta hipótesis. México, es considerado como uno de los centros de origen del guayabo (Mata y Rodríguez, 1990; Hayes, 1960; Popenoe, 1974), por lo que presenta una gran variabilidad fenotípica (Lakshminarayana y Moreno, 1978; Tong *et al.*, 1991). La variabilidad fenotípica, es aquella que se expresa en caracteres visibles, que pueden ser de tres tipos: botánicos-taxonómicos (caracteres morfológicos que describen e identifican a la especie; de alta heredabilidad y poca variabilidad); morfoagronómicos (relevantes en la utilización de las especies cultivadas, aceptable heredabilidad y son afectados por el ambiente) y evolutivos (se expresan en características cualitativas debido a estímulos ambientales: presencia de plagas, enfermedades, estrés a temperatura, agua, nutrientes y otros). El otro tipo de variabilidad es la que no se expresa en características visibles y para su identificación, se requiere del uso de técnicas especiales de laboratorio, tales como los marcadores moleculares (Hidalgo, 2003; Chávez, 2003).

En guayabo, se han hecho varias investigaciones que dan cuenta de la variabilidad expresada en caracteres visibles, entre ellas se pueden citar la de Padilla *et al.* (2002), quienes evaluaron 12 selecciones de guayabo 'Media China' y encontraron diferencias entre ellas en la composición mineral de las hojas, el largo y el ancho de las mismas, diámetro polar y ecuatorial de fruto, etc.; no obstante, estas variaciones no obtuvieron diferencias estadísticas entre las selecciones estudiadas, lo que los condujo a la conclusión de que el guayabo 'Media China' tiene una reducida variabilidad fenotípica.

También, Hernández *et al.* (2003) observaron una amplia variabilidad fenotípica de la planta de guayabo entre y dentro de los 12 árboles seleccionados de cada una de las cuatro plantaciones estudiadas. Por su parte, Perales y Silguero (1995) evaluando diferentes características morfológicas en 17 cultivares provenientes del estado de Zacatecas, encontraron variabilidad en la forma, color de la epidermis y contenido de sólidos solubles totales de los frutos.

Además, la respuesta heterogénea en rendimientos del guayabo está asociada principalmente: al cultivar, edad, origen (sexual y asexual) de la planta (Mata y Rodríguez, 2000) y a la adaptación a altos niveles de pH en los suelos (Cakmak y Braun, 2001); así como a las fuentes y niveles de fertilización (González, *et al.*, 2002). Todas las características anteriores son factores que hacen posible la expresión de la variabilidad visible presente en este frutal; por ejemplo, Mosqueda (1981) en un experimento en Veracruz, México, en plantaciones de guayabo, utilizando la fórmula 90-80-80 obtuvo rendimientos de hasta 31.9 t·ha<sup>-1</sup>, mientras que Nieto (1996) en un trabajo experimental con plantas de guayabo 'Media China' en la que utilizó la fórmula 122-65-61 y otros nutrientes al follaje como, Zn, Fe, Cu, Mn, Mg y K a cantidades de 15, 22.5, 15, 15, 6 y 15 ml·litro<sup>-1</sup>, respectivamente, encontró un incremento del 75 % del rendimiento, con respecto al testigo, mientras que González *et al.* (1997) utilizando el mismo cultivar y la fórmula 60-60-60, obtuvieron rendimientos cercanos a las 30 t·ha<sup>-1</sup>.

Entre los estudios realizados en guayabo que documentan la variabilidad genética que no siempre se expresa en características visibles, mediante el uso de marcadores moleculares, se puede citar el de Prakash *et al.* (2002) quienes analizando la diversidad molecular en cuatro genotipos de guayabo usando marcadores RAPD's,

encontraron una distancia genética máxima de 54 % entre *Psidium guajava* y *Psidium quadrangulare* y una distancia mínima de 11 % entre las selecciones SWY-1 y GR-1 de *P. guajava*, lo que ellos consideraron como una variabilidad baja o moderada. Padilla *et al.* (2002) utilizando RAPD's y doce selecciones de guayabo 'Media China' en México, observaron una similitud genética del 88 al 96 % entre las selecciones, lo que indicó una reducida variabilidad genotípica en las plantas. Contrario a lo anterior, Hernández *et al.* (2003) en un estudio de variabilidad de guayabo utilizando marcadores RAPD's y AFLP's observaron amplia variabilidad genética entre árboles de guayabo dentro y entre plantaciones de Calvillo, Aguascalientes, México. Por su parte Giancola *et al.* (2002) en un intento por asociar la variabilidad fenotípica y la genotípica, utilizando varias características morfológicas y otras genéticas, obtenidas a través del uso de marcadores moleculares como RAPD's, AFLP's y SSR en soya, mediante la generación de dendrogramas, encontraron una afinidad entre los coeficientes de los marcadores de 0.216 en promedio, lo cual confirma la utilidad de los marcadores en estudios de la variabilidad no visible.

Por los antecedentes anteriores, en la presente investigación se planteó como objetivo determinar la variabilidad genotípica y fenotípica de plantas de guayabo 'Media China', procedentes de semilla, utilizando algunas características genéticas obtenidas mediante el empleo de marcadores RAPD's, así como algunas características morfológicas y, establecer el grado de asociación entre ellas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Fase experimental en campo e invernadero

De tres plantaciones de guayabo del municipio de Benito Juárez y de una plantación más en Zitácuaro, Michoacán, México; localizados a los 19°17' 00" de LN, y 100° 26' 30" de LO; 19° 26' 00" de LN, y 100° 22' 00" de LO, respectivamente, basado en datos de dos años, se seleccionó uno de los árboles vigorosos y de alto rendimiento de donde se seleccionó un fruto; se extrajeron sus semillas, se lavaron y se secaron a la sombra por cuatro días. Las semillas de los cuatro frutos se mezclaron y se sometieron a un tratamiento de escarificación para acelerar su germinación, colocándose en agua caliente a una

temperatura de 50 °C durante un minuto; para la germinación de las semillas, éstas se colocaron en agrolita en condiciones de invernadero durante 22 a 30 días.

Una vez que las plantas desarrollaron cuatro pares de hojas, se seleccionaron al azar 200 de ellas y se transplantaron en bolsas que contenían suelo tipo feozem (para evitar compactación), permaneciendo en él durante seis meses, alcanzando un desarrollo de 40 y 50 cm de altura (12 a 14 pares de hojas). Después, se lavaron y transplantaron a raíz desnuda en macetas de 25 x 25 con sustrato de arena sílica de 20 a 30 mallas (0.09 a 0.13 centímetros). Los riegos en almácigo y en las bolsas se dieron con agua corriente cuyo contenido mineral se presenta en el Cuadro 1. Desde la germinación y durante todo el desarrollo de la planta, al interior del invernadero se registraron temperaturas de 25.22, 35.80 y 12.04 °C; humedad relativa de 64.24, 92.75 y 27.02 %; intensidad luminosa de 244.16, 732.00 y 26.64  $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$  (PAR); media general, máxima promedio y mínima promedio, respectivamente, y una temperatura promedio del sustrato de 21 °C.

Las concentraciones y fuentes usadas en la solución nutritiva por tratamiento, se indican en el Cuadro 2. El diseño fue el de un bloques al azar generalizado con seis repeticiones de los tratamientos por cada bloque, los bloques se ubicaron en dirección norte-sur (sumando un total de 144 plantas) y la unidad experimental fue una maceta.

La solución nutritiva completa (testigo) empleada en fertirrigación de las macetas fue la propuesta por Hoagland y Arnon (1938). De esta solución se aplicaron 150 ml diariamente por maceta, en dos recipientes (con tres perforaciones de 1 mm de diámetro en el fondo), y se colocaron para este fin en la superficie del sustrato y a cada lado del tallo de la planta.

Después de cuatro meses de aplicación de la solución nutritiva, se empezaron a observar síntomas de deficiencias de hierro y zinc en las hojas, por lo que dentro de cada tratamiento se clasificaron las plantas, con y sin síntomas de deficiencias. Dentro de las primeras, se ubicaron a todas aquellas plantas de aspecto normal sin alteraciones visibles, en tanto que dentro de las segundas se ubicaron aquellas que presentaban hojas pequeñas y cloróticas. Debido a la sintomatología de deficiencia, la concentración de zinc se incrementó de 0.05 a 0.85 mg·litro<sup>-1</sup>, y se sustituyó al sulfato

**CUADRO 1.** Análisis químico de agua<sup>2</sup> utilizada para riego en almácigo de plantas de guayabo "Media China", hasta los diez meses de edad.

pH	CE	Ca	Mg	K	Na	RAS	N Inorgánico	P	B	Fe	Cu	Mn	Zn	Pb	Cd
(dS·cm <sup>-1</sup> )		meq·litro <sup>-1</sup>						mg·litro <sup>-1</sup>							
6.90	0.48	2.00	2.00	0.28	1.00	1.00	3.1	0.16	0.018	ND	ND	ND	ND	ND	ND

<sup>2</sup>Análisis procesados en el Laboratorio de Fertilidad del Departamento de Suelos de la Universidad Autónoma Chapingo.  
ND: No detectado; CE: conductividad eléctrica; RAS: relación de adsorción de sodio.

**CUADRO 2. Concentración de elementos nutritivos en la solución<sup>2</sup>, de cada uno de los tratamientos aplicados a plantas de guayabo 'Media China' para la inducción de deficiencias nutrimentales en condiciones de hidroponía utilizando arena sílica y en invernadero.**

Tratamiento	N	P	K	Ca	Mg	S	Fe	Mn	B	Cu	Zn	Mo
(mg·litro <sup>-1</sup> )												
Testigo (1)	210	31	234	160	48	64	2.5	0.5	0.5	0.02	0.85	0.02
2	14	31	234	160	48	64	2.5	0.5	0.5	0.02	0.85	0.02
3	210	5	234	160	48	64	2.5	0.5	0.5	0.02	0.85	0.02
4	210	31	60	160	48	64	2.5	0.5	0.5	0.02	0.85	0.02
5	210	31	234	40	48	64	2.5	0.5	0.5	0.02	0.85	0.02
6	210	31	234	160	24	64	2.5	0.5	0.5	0.02	0.85	0.02
7	210	31	234	160	48	15	2.5	0.5	0.5	0.02	0.85	0.02
8	210	31	234	160	48	64	0.25	0.5	0.5	0.02	0.85	0.02

<sup>2</sup>Las fuentes de fertilizantes utilizados fueron: KNO<sub>3</sub>, Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, KOH, CaCl<sub>2</sub>, CaO, MgO, KNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub> NO<sub>3</sub>, Mg (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O y Fe-EDHTA (etilendiamina dihidroxifenil ácido acético), ZnSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub>·(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub> Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> 4H<sub>2</sub>O, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>.

de hierro y de zinc por un quelato comercial que contenía 6 y 2 % de ambos elementos, respectivamente (Fe-EDHTA). La solución nutritiva se cambió cada diez días y antes de iniciar el riego con la nueva solución se drenó el sustrato con agua corriente, dejando cuatro días a la planta sin aplicar solución nutritiva. Con la clasificación inicial de las plantas, con presencia y ausencia de síntomas inducidos por la baja disponibilidad de hierro y zinc, se obtuvieron los patrones RAPD's.

### Patrones RAPD en el laboratorio

Se tomaron al azar 82 plantas de guayabo de las 144 de que constituía la investigación, de las cuales, 43 genotipos no habían presentado síntomas visuales de deficiencia y 39 sí los habían manifestado. La purificación del ADN se realizó según protocolos propuestos por De la Cruz *et al.* (1997). A partir de hojas jóvenes (tercer par de hojas de brotes del año) se tomó 1.0 g de tejido, se maceró en un mortero con nitrógeno líquido adicionando primero, 390 µl de amortiguador CTAB (Cuadro 3) al 4 % y a los 2 minutos de maceración se agregaron 1.5 ml del amortiguador STE (Cuadro 3). El macerado se continuó hasta obtener una consistencia líquida, después, el líquido se transfirió a tres tubos eppendorf, estos tubos permanecieron en hielo el tiempo que duró la maceración de todas las muestras del día, donde se agregaron 50 µl de SDS (dodecil sulfato de sodio) al 20 % (p:v) y 170 µl de acetato de potasio 5 M, se centrifugó durante 5 minutos a 16,000 rpm, se separó el sobrenadante y se colocó en tubos eppendorf nuevos. Después se adicionaron 150 µl de isopropanol, lavándose en tres ocasiones con 200 µl de etanol al 70 % (v:v). Finalmente, el ADN se resuspendió en 100 µl de TE (Tris-10 mM + ácido tetracético diamina etileno 1 mM) y se guardó a 4 °C. Posteriormente se verificó la integridad del ADN en un gel de agarosa al 0.8 % y se cuantificó en un espectrómetro Perkin Elmer Lambda Bio 120 V. Para la cuantificación se mezclaron en un tubo eppendorf 2 µl de ADN con 60 µl de agua bidestilada el

que se colocó en el espectrómetro y la absorbancia obtenida se calculó en ng·µl<sup>-1</sup> de ADN.

**CUADRO 3. Reactivos utilizados en la preparación de los amortiguadores CTAB al 4 % y STE. Para la determinación de ADN en hojas con y sin síntomas de deficiencias de hierro y zinc en guayabo.**

Reactivos	Amortiguador	
	CTAB al 4 %	STE
Tris-HCl 1 M pH 8.0	5 ml	5 ml
EDHTA 0.5 M pH 8.0	2 ml	5 ml
CTAB 10 % (p:v)	20 ml	
NaCl 5 M	15 ml	1 ml
PVP40 10 % (p:v)	10 ml	
Ácido ascórbico	25 mg	
β-mercaptoetanol	35 µl	35 µl

Para la obtención de los patrones RAPD se emplearon 20 iniciadores de la serie A de Operon, de la compañía Bioselec, S. de R. L. MI., USA, con los que se llevó a cabo la electroforesis en geles de agarosa al 1.2 %, para realizar las reacciones (Cuadro 4), se seleccionaron los iniciadores A01, A02, A03, A04, A09, A15, A17, A19 y A20, los cuales mostraron el más claro patrón de bandas.

**CUADRO 4. Número de ciclos, temperatura y tiempo de duración por ciclo, bajo los cuales se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa para la amplificación del ADN en el termociclador, para la obtención de los patrones RAPD.**

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo de duración
1	94	2 minutos
38	94, 40 y 72	30, 30 seg y 1:30 min, respectivamente
1	72	3 minutos

La mezcla de sustancias y compuestos químicos para la reacción en cadena del ADN polimerasa (PCR) se llevó a cabo en un volumen de 25  $\mu$ l de solución (Cuadro 5). Los productos se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.2 % más amortiguador TAE (Trisma base 40 mM Ph 7.8, Acetato de sodio 20 mM y EDTA 2 mM pH 8.0), durante 3 h a 85 V. Finalmente, los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 mg·ml<sup>-1</sup>) y se fotografiaron en luz ultravioleta (UV). La comparación entre los genotipos se hizo mediante la similitud y diferencia de los patrones de bandas, asignándose el valor 0 a la ausencia y 1 a la presencia de una banda. Se cuantificó el número de bandas de la amplificación generada para cada iniciador, asignándose un número de acuerdo con su migración en el gel. A la banda de mayor peso molecular se le asignó el número uno y así sucesivamente hasta la banda con menor peso molecular. Se realizó el registro de los patrones RAPD's obtenidos con los nueve iniciadores para los 82 genotipos y con esta información se construyó la matriz básica de datos (MBD).

**CUADRO 5. Componentes de la mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa, para la obtención de los patrones RAPD.**

Componentes de la mezcla	Volumen ( $\mu$ l)
Agua bidestilada estéril	3.0
Amortiguador de PCR 10x	2.5
Oligonucleótidos 10 pmol· $\mu$ l <sup>-1</sup>	3.0
ADN genómico 20 ng· $\mu$ l <sup>-1</sup>	2.0
DNTP's	10.0
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	1.0
Taq ADN Polimerasa	3.5

## Evaluación de los caracteres morfológicos

De las seis plantas por bloque de que constaba el experimento, solo se eligieron tres, dando un total de 72 plantas y de éstas, solo a 46 se les purificó ADN, por lo tanto fueron 46 genotipos a los cuales se les evaluó tanto caracteres morfológicos como la obtención de patrones RAPD's. Los caracteres evaluados de las 72 plantas fueron 16 (Cuadro 6), mientras que los índices calculados con los pesos fresco y seco de raíz, tallo y hojas fueron 12 (Cuadro 7). Con la obtención de índices se buscó reducir el efecto del ambiente sobre las variables medidas. Al respecto González-Andrés (2002) señaló que contribuye más la relación anchura/longitud de la hoja que los caracteres por separado.

## Análisis Estadístico

### Patrones RAPD's

Con la codificación de presencia (1) y ausencia (0), producto de los patrones de las bandas se construyó una

matriz básica de datos (MBD), donde en las columnas se colocaron los 82 genotipos y en las filas, las 49 bandas producto de los nueve iniciadores. A partir de la MBD se calculó una matriz de similitud utilizando el coeficiente de Jaccard (1908, citado por Sokal y Sneath, 1963), para de ahí construir un dendrograma utilizando el programa NTSYS-Pc versión 2.1 y el programa DARwin versión 3.6. A partir de la MBD con la que se construyó este dendrograma, se realizó un remuestreo ("bootstrap") de 1000 combinaciones entre los 82 genotipos, utilizando el programa FreeTree (Hampel *et al.*, 2001) hasta llegar a obtener un dendrograma de mayor representación, usando el programa TreeView.

**CUADRO 6. Caracteres morfológicos evaluados en plantas provenientes de semilla de guayabo 'Media China' en condiciones de hidroponía e invernadero.**

Caracter (unidad)	Simbología
Diámetro de tallo (cm)	DIÁMTALLO
Altura total de planta (cm)	A. TOTAL
Altura parcial de planta (cm) (crecimiento por efecto del tratamiento)	APP
Número de hojas	NH
Total de brotes	TB
Longitud de brotes (cm)	LB
Nudos por brote	NB
Peso fresco de raíz (g)	PFR
Peso fresco de hojas (g)	PFH
Peso fresco de tallos (g)	PFT
Peso fresco de vástago (g) (suma de hojas y tallos)	PFV
Peso de ápices radicales (g)	PAP
Número de Ápices radicales	NAP
Área foliar (cm <sup>2</sup> )	AF

**CUADRO 7. Índices obtenidos de combinaciones de los caracteres de peso fresco y seco de raíz, tallo y hojas de plantas de guayabo 'Media China' provenientes de semilla en hidroponía e invernadero.**

Relación de variables	Simbología
Peso seco de hojas/Peso fresco de hojas	PSH/PFT
Peso fresco de hojas/Peso fresco de raíz	PFH/PFR
Peso fresco de tallo/Peso fresco de hojas	PFT/PFH
Peso fresco de raíz/Peso fresco de tallo	PFR/PFT
Peso fresco de raíz/Peso fresco de vástago	PFR/PFV
Peso fresco de vástago/Peso fresco de raíz	PFV/PFR
Peso seco de tallo/Peso fresco de tallo	PST/PFT
Peso fresco de hojas/Peso seco de hojas	PFH/PSH
Peso fresco de raíz/Peso seco de raíz	PFR/PSR
Peso fresco de tallo/Peso seco de tallo	PFT/PST
Peso seco de raíz/Peso seco de vástago	PSR/PSV
Peso seco de raíz/Peso fresco de raíz	PSR/PFR

Finalmente y con el objetivo de conocer el aporte de cada caracter en la variabilidad existente entre los genotipos analizados, se calcularon los componentes principales utilizando la MBD.

## Datos Morfológicos

### Medidas absolutas y relativas

Con el propósito de eliminar aquellos caracteres con un nivel de asociación mayor o igual al 80 %, se realizó un análisis de correlación entre los dieciséis caracteres absolutos y doce relativos derivados de los índices, seleccionando aquellos caracteres con el mayor coeficiente de variación, quedando diecisiete caracteres en total. Los datos de los caracteres se estandarizaron utilizando el programa NTSYS, con el fin de lograr continuidad entre ellos y homogeneizar las unidades de medida; posteriormente se construyó una matriz básica de datos (MBD) cuantitativa, en columnas se colocaron 72 genotipos y en las filas los 17 caracteres; de ahí se construyó una matriz de disimilitud y posteriormente se obtuvo un dendrograma, utilizando el coeficiente  $\chi^2$  (Sneath y Sokal, 1973) y el método jerárquico aglomerativo de UPGMA "Unweighted pair-group method using arithmetic averages". Por último se hizo un análisis de componentes principales para conocer el aporte de cada uno de los caracteres en la variabilidad entre los genotipos.

### Análisis de agrupamientos

Para conocer la precisión y nivel de ajuste, así como para obtener los estimadores de la magnitud de las diferencias entre los dendrogramas obtenidos por cada uno de los métodos, se construyó la matriz cofenética, utilizando la matriz SAHN de características morfológicas, comparándose con la matriz de similitud de los RAPD's. La comparación se llevó a cabo utilizando la prueba matriz-correspondencia de Mantel (1967, citado por Giancola *et al.*, 2002). La significancia de Z se determinó por comparación con el valor observado de Z y el valor crítico obtenido de Z de esta distribución permutable del Programa NTSYS-Pc versión 2.1 (Exetec Software, USA). Posteriormente se construyó otra matriz básica de datos, utilizando el coeficiente  $\chi^2$  y el programa NTSYS versión 2.1, para construir el dendrograma, colocando los productos o bandas obtenidos con la técnica del ADN amplificado al azar (RAPD) y los caracteres morfológicos en las filas y 46 genotipos en las columnas, estos 46 genotipos forman parte tanto de las 82 plantas a las que se les purificó ADN, así como de las 72 que se les midieron caracteres morfológicos. El Índice de Diversidad (ID) o polimorfismo para los marcadores

RAPD, se estimó mediante la fórmula  $ID = 1 / \sum_i P_i^2$ , donde

$P_i$  es la frecuencia iésima del alelo i, considerándose cada alelo individual como un locus simple.

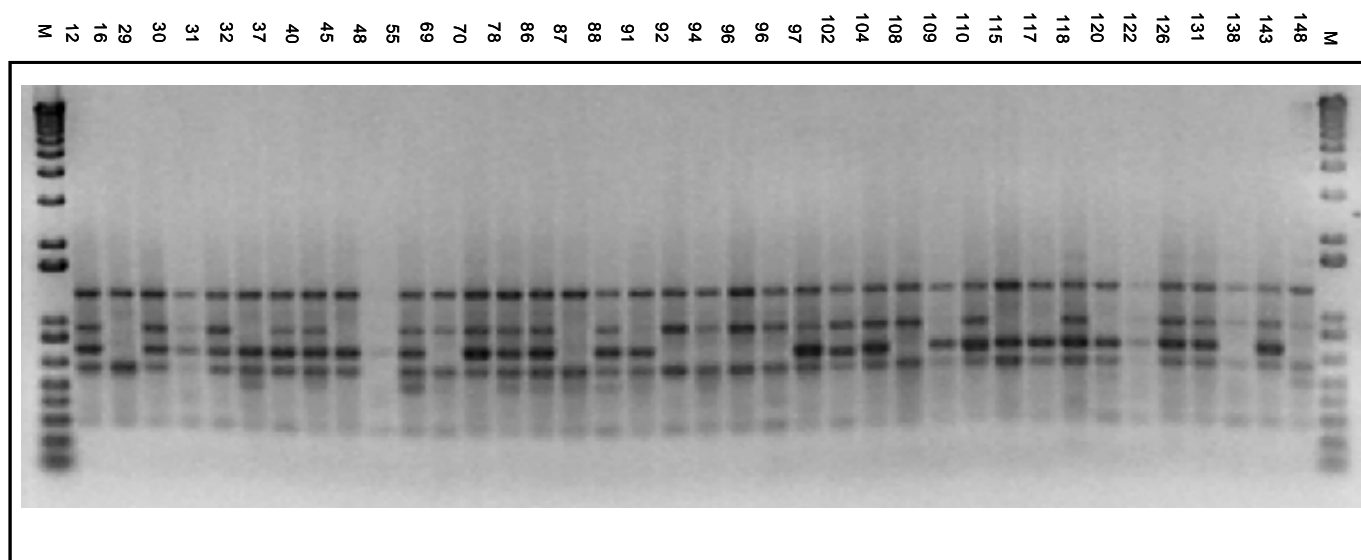
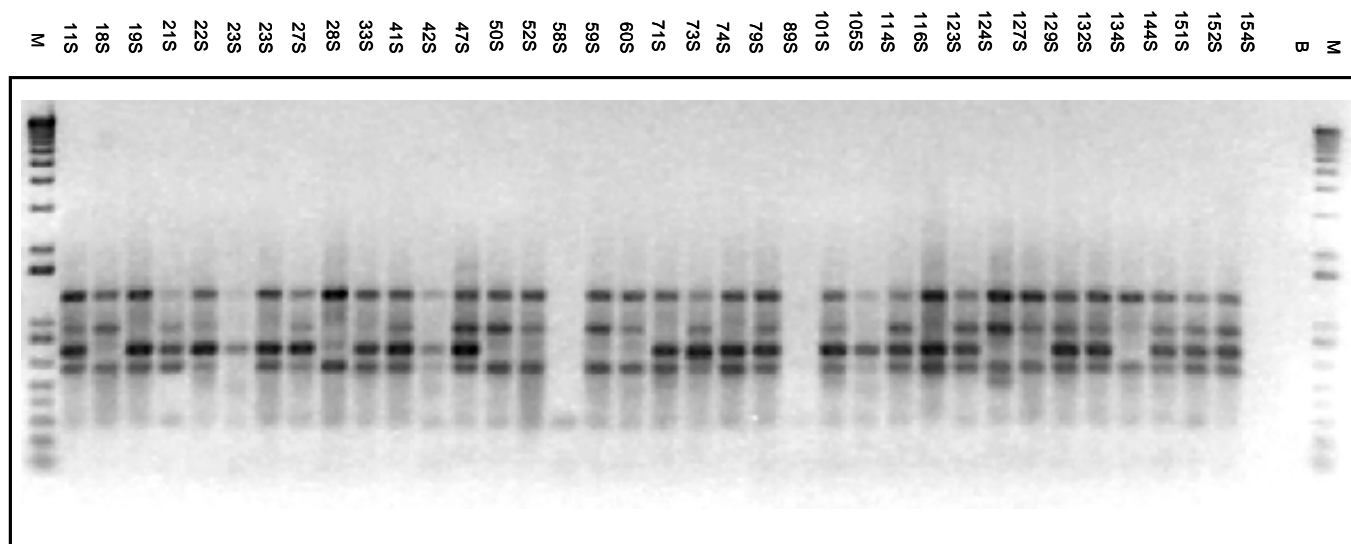
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Análisis de los patrones de marcadores RAPD

De los nueve iniciadores analizados, sólo dos de ellos expresaron polimorfismo menor al 100 %, OPA01 y OPA04, con 80 y 86 % de polimorfismo, respectivamente. De un total de 49 bandas presentadas, el 96 % fueron polimórficas. Se pudo apreciar la presencia de polimorfismo entre los diferentes genotipos (Figura 1), lo que sugiere la existencia de variabilidad genética entre las plantas procedentes de semilla de frutos colectados en diferentes plantaciones, pero del mismo tipo 'Media China'.

En el dendrograma pueden apreciarse cuatro grupos bien definidos (Figura 2). El grupo I se formó con los genotipos 73S, 42S, 27S, 129S, 33S, 134S, 105S, 74S, 23S, 79S, 41S, 21S, 18S, 132S, 28S, 151S, 71S, 60S, 89S, 108, 101S, 159, 123S, 116S, 58S, 19S, 52S, 155, 22S, 11S y 127S, la mayoría de ellos con síntomas visibles de deficiencias nutrimentales de hierro (Fe) y zinc (Zn). Después de un análisis de remuestreo que dio origen a un dendrograma (Figura 3), donde los genotipos 96, 59S, 3S y 50S, que se ubicaban en el grupo II, pasan a formar un grupo independiente, muy cercano a este grupo I; con excepción de cuatro genotipos que no tienen la letra S, todos los demás, presentan una alta frecuencia (74 %) del loci o banda A03-3 con un peso de 1.3 kb, producto de la amplificación, usando un iniciador con secuencia 5'-AGTCAGCCAC-3', la cual se relaciona más con aquellos genotipos que presentan síntomas de deficiencias visibles a bajos niveles de concentración de Fe y Zn (Cuadro 8). En el grupo II se ubicaron los genotipos 94, 69, 96, 88, 37, 31, 55, 138, 30, 148, 120, 109, 48, 23S, 122, 114S, 47S, 152S, 124S, 154S, 115, 16, 96, 59S, 3S, 144S y 92. En un análisis de remuestreo los genotipos 96, 59S, 3S, y 50S salen de este grupo, por lo que exceptuando a seis genotipos que presentan la letra S, el resto no presentan síntomas de deficiencia, a pesar de que los agrupamientos son a diferentes distancias respecto al punto de origen (Figuras 2 y 3). Considerando el mismo análisis de remuestreo y sus valores de distancia entre las ramas del subgrupo que forman los genotipos con síntomas 114S, 47S y las ramas de los genotipos sin síntomas 122 y 48, sugieren una diferencia y una separación muy marcada de estas cuatro plantas con el resto de los genotipos, debido probablemente al 30 % de alogamia de la especie. Al grupo III lo constituyen los genotipos 104, 97, 143, 158, 78, 126, 110, 157, 91, 86, 87, 118, 117, 12, 156, 70, 40, 29, 45, 32, 2S, 131 y 102, todos ellos sin síntomas de deficiencia visible en sus hojas, a excepción del genotipo 2S.

Una característica común que comparten estos genotipos es la presencia de los loci o bandas denominadas A20-4, A20-2 y A20-1 cuya frecuencia es de 86.5, 78 y 89 %, con un peso molecular de 0.85, 1.4 y 1.6 kb, respectivamente (Cuadro 8), obtenidos mediante un iniciador con secuencia 5'-GTTGCGATCC-3', asociado con

**A****SIN SÍNTOMAS****B****CON SÍNTOMAS**

**FIGURA 1.** Patrones de bandas RAPD's obtenidos usando el iniciador OPA19. **A.** Genotipos sin síntomas foliares de deficiencia nutrimental. **B.** Genotipos con síntomas foliares, en 82 genotipos provenientes de semilla de guayabo 'Media China' separados en gel de agarosa 1.2 %. La letra S delante del número se refiere a plantas con síntomas y sin la letra S plantas sin síntomas de deficiencia nutrimental.

aquellos genotipos que no presentaron síntomas de deficiencia en sus hojas a bajas concentraciones de Fe y Zn. En el grupo IV se encuentra el genotipo 50S, el cual, una vez hecho el análisis de remuestreo, pasa a formar parte de otro grupo muy cercano a los grupos I y II (Figuras 2 y 3).

Estos resultados indican que el método utilizado es eficiente para separar y clasificar los genotipos sin y con

síntomas de deficiencia nutrimental visible en hojas, a partir de características genéticas determinadas a través de los patrones de marcadores RAPD's. Ello permite establecer una asociación entre el genotipo de las plantas con la ausencia o presencia de síntomas inducidos por bajos niveles nutrimentales. Dicho de otra manera, los resultados sugieren que la ausencia o presencia de síntomas en las plantas a bajas concentraciones de Fe y Zn, está determinada genéticamente. Por lo que se les puede

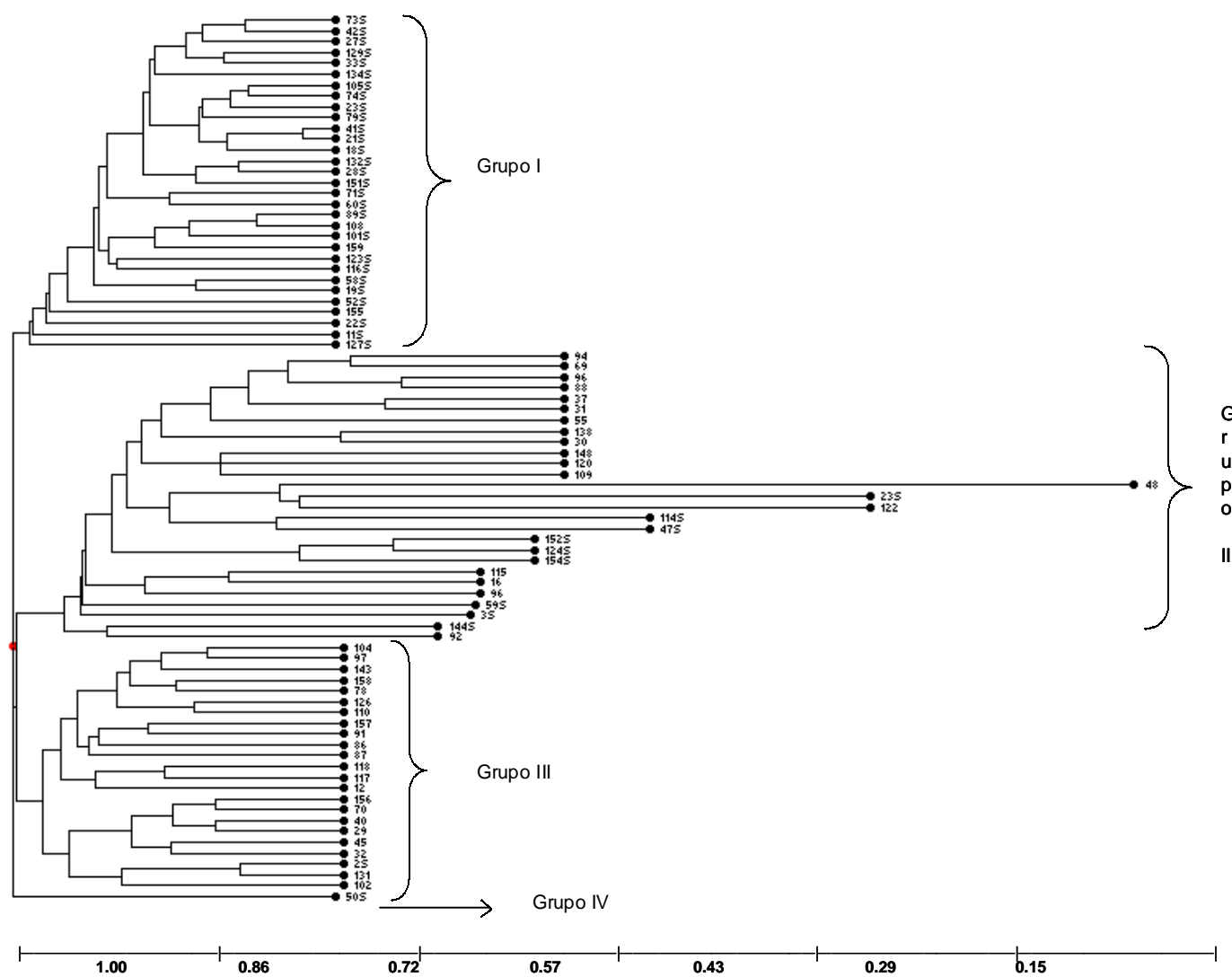


FIGURA 2. Dendrograma construido mediante el coeficiente Jaccard con los patrones de bandas RAPD's obtenido de hojas de 82 genotipos de guayabo y separados por electroforesis en gel de agarosa 1.2 %. La letra S delante del número denota plantas con síntomas y sin la letra S se refiere a plantas sin síntomas de deficiencia nutrimental, todas ellas provenientes de semilla de guayabo 'Media China'.

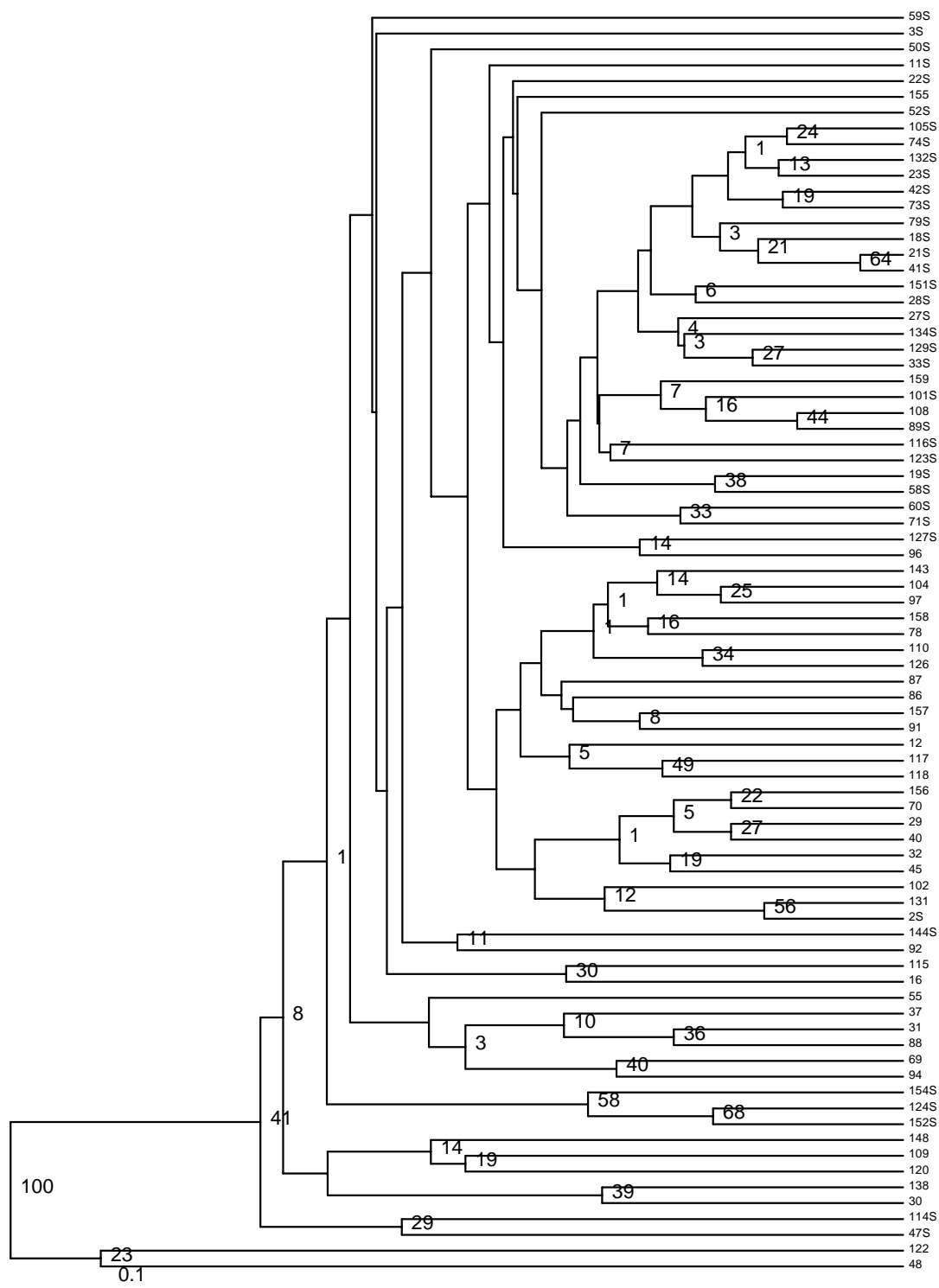
CUADRO 8. Frecuencia de las bandas OPA20-4, OPA20-2, OPA20-1 y OPA03-3, cuya presencia hacen posible la diferencia entre genotipos de guayabo 'Media China' provenientes de semilla, en hojas con y sin síntomas de deficiencia de Fe y Zn.

Genotipo	Banda (% de presencia)			
	A20-4	A20-2	A20-1	A03-3
Sin síntoma	86.5	78	89	46
Con síntoma	41.0	18	64	74

agrupar como genotipos con síntomas (grupo I), sin síntomas (grupo III) y mixtos (grupo II). La formación que aportan este sistema de agrupamientos es el resultado de la combinación que ocurre entre las diferentes bandas obtenidas con el análisis RAPD's.

Por la frecuencia y su combinación con que aparecen presentes las bandas, así como por los síntomas de las plantas, se infiere que la respuesta a la baja fertilidad es poligénica (Hidalgo *et al.*, 2003; Giancola *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 2001) ya que un solo marcador no es capaz de definir la presencia o ausencia de síntoma de deficiencia; se requiere una combinación frecuente de los mismos para determinarla mediante asociación.

La cantidad de bandas probablemente se refiera a un alto grado de polimorfismo a nivel genético detectado por los marcadores RAPD's, como consecuencia de la alta variabilidad genética (Hidalgo, 2003; Chávez, 2003) dentro del guayabo tipo 'Media China', lo que puede asociarse con el 30 % de alogamia que presenta la especie (Mata y Rodríguez, 1990). Estos resultados contrastan con los obtenidos por Padilla *et al.* (2002) quienes en un análisis



**FIGURA 3.** Dendrograma construido a partir de 1000 combinaciones de remuestreo obtenida de los productos RAPD's de 82 genotipos de hoja de guayabo provenientes de semilla 'Media China', mediante el coeficiente de Jaccard. Los números en las ramas indican el número de veces en porcentaje en que la topología de una rama particular se repite.

con RAPD's en 12 genotipos del tipo 'Media China', encontraron una reducida variabilidad genotípica, debido posiblemente a que las plantas utilizadas en el estudio provenían de estacas enraizadas y en nuestro caso las

plantas provinieron de semilla o probablemente por el tipo de iniciadores utilizados.

El índice de diversidad promedio para los RAPD's

detectado en el presente estudio fue de 0.744, muy superior al encontrado por Giancola *et al.* (2002) para soya que fue de 0.385, este alto índice de polimorfismo permite ubicar al método de marcadores RAPD's utilizado, como una técnica eficiente para el agrupamiento de genotipos sin y con síntomas visibles como una respuesta a los bajos niveles de elementos disponibles en la solución nutritiva. Este resultado concuerda con lo citado por Chávez (2003); Prakash *et al.* (2002); Hernández *et al.* (2003); Legaria (2003); Weber (2003), quienes trabajando con diferentes especies, concluyeron que los marcadores RAPD's son una técnica valiosa, eficiente, útil y actual para los estudios de variabilidad intra e inter poblacional, dado que son genéticamente neutros a los procesos de selección y no son influenciados por el ambiente. Dichos marcadores también permiten detectar altos niveles de polimorfismo, aunque dicho polimorfismo no siempre se refleja en el fenotipo de los organismos. Este nivel alto de variabilidad, en cuanto a la respuesta de las plantas a bajas concentraciones de Fe y Zn, se ve reforzado con los resultados obtenidos del análisis de componentes principales (ACP), donde se encontró que son diez componentes principales los que explican conjuntamente apenas el 59 % de la variabilidad y de éstos (Cuadro 9), los cuatro primeros explicaron tan solo el 35 % de la misma.

La presencia de las bandas A17-3, A17-4, A15-4, A17-1, obtenidas con los iniciadores OPA15 y OPA17, se asocian a genotipos sin y con síntomas visibles en las hojas y, son las que mayor contribución aportaron a la separación entre los genotipos para el componente 1. En el componente 2 lo hacen las bandas A20-2, A20-4 y A04-1, obtenidas con los iniciadores OPA20 y OPA04, bandas con una asociación más frecuente con genotipos con ausencia de síntomas de deficiencia a Fe y Zn. Para el componente 3 las bandas de mayor contribución son A03-2, A03-3 y A02-1, producto de los iniciadores OPA03 y OPA02, la mayor frecuencia de las dos primeras bandas se asocian con genotipos que presentan síntomas de deficiencia; mientras que para el componente 4 son: A04-4, A19-5 y A15-5, obtenidas con los iniciadores OPA04, OPA15 y OPA19 (Cuadro 10).

### Respuesta de los caracteres morfológicos

Se encontró que las diferencias o polimorfismo se reflejó mediante la formación de cuatro grupos de genotipos: el grupo I incluyó al 27S, 28S, 86, 44S, 43S, 96, 129S, 25S, 13S, 101S, 105S, 134S, 2S, 17S, 59S, 124S, 23S, 132S, 137 y 118; con excepción de cuatro genotipos todos los demás presentan síntomas de deficiencia nutrimental en el follaje de Fe y Zn. Este grupo es el más distante, respecto al punto de origen de la rama central; los tres últimos genotipos, pero sobre todo el último, son los que marcan la mayor diferencia dentro y entre los otros grupos. El grupo II formado con los genotipos 55, 143, 65 y 122, ninguno presenta síntomas de deficiencia. Al grupo III lo constituyen los genotipos 89S, 111S, 17, 108, 33S, 110,

**CUADRO 9. Valores de Eigen-valor y varianza acumulada obtenida del análisis de componentes principales procedente de patrones de bandas RAPD's de hoja de 82 genotipos de guayabo 'Media China' derivados de semilla.**

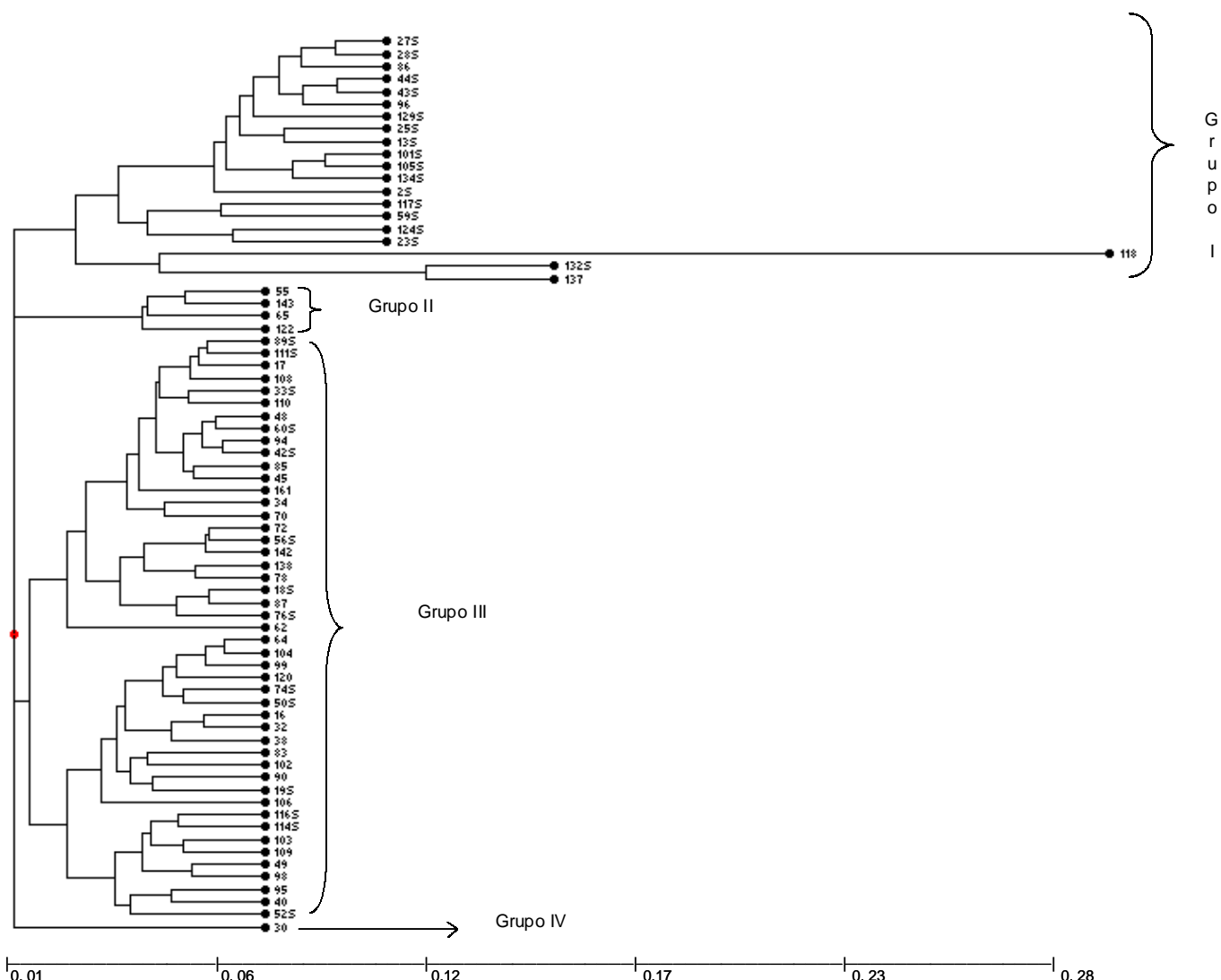
Componente	Eigen-valor	Porcentaje (%)	
		Individual	Acumulada
1	6.36891976	13.5509	13.5509
2	4.47055561	9.5118	23.0627
3	3.44786036	7.3359	30.3986
4	2.54734887	5.4199	35.8185
5	2.25465631	4.7971	40.6156
6	1.97976167	4.2123	44.8279
7	1.92851846	4.1032	48.9311
8	1.74548907	3.7138	52.6449
9	1.59297648	3.3893	56.0342
10	1.49356129	3.1778	59.2120
11	1.43667415	3.0568	62.2688
12	1.31792228	2.8041	65.0729
13	1.23924027	2.6367	67.7095
14	1.15067235	2.4482	70.1578
15	1.12107089	2.3853	72.5430
16	1.06846933	2.2733	74.8164
17	1.01681374	2.1634	76.9798
18	0.89736824	1.9093	78.8891
19	0.88631527	1.8858	80.7749
20	0.79036966	1.6816	82.4565
21	0.76833185	1.6347	84.0913
22	0.70466309	1.4993	85.5906
23	0.60730084	1.2921	86.8827
24	0.57935505	1.2327	88.1154
25	0.53251919	1.1330	89.2484
26	0.50712871	1.0790	90.3274
27	0.45130627	0.9602	91.2876
28	0.42035493	0.8944	92.1820
29	0.39654101	0.8437	93.0257
30	0.37252428	0.7926	93.8183
31	0.35509970	0.7555	94.5738
32	0.32484075	0.6912	95.2650
33	0.30635547	0.6518	95.9168
34	0.26161225	0.5566	96.4734
35	0.24106756	0.5129	96.9863
36	0.20651517	0.4394	97.4257
37	0.19517224	0.4153	97.8410
38	0.18560705	0.3949	98.2359
39	0.15455034	0.3288	98.5647
40	0.14250688	0.3032	98.8679
41	0.13330618	0.2836	99.1515
42	0.11970590	0.2547	99.4062
43	0.09560789	0.2034	99.6097
44	0.08524466	0.1814	99.7910
45	0.06210175	0.1321	99.9232
46	0.03611695	0.0768	100.0000

**CUADRO 10. Valores de Eigen-vector en los primeros cuatro ejes del análisis de componentes principales procedente de patrones de bandas RAPD's de hoja de 82 genotipos de guayabo 'Media China' derivados de semilla.**

Carácter	Componente Principal			
	1	2	3	4
A20-2	0.0829	<b>0.7564</b>	0.1461	0.1160
A17-2	<b>0.5735</b>	-0.3513	0.1806	0.1881
A09-4	-0.2313	-0.0234	0.0370	0.3918
A02-1	0.1801	0.1531	<b>0.5251</b>	0.1732
A03-3	0.1797	-0.2854	<b>0.5626</b>	0.0471
A15-4	0.6437	-0.3875	-0.0278	-0.1498
A19-2	0.2652	0.3114	-0.1612	-0.2077
A04-6	0.4299	-0.4290	0.510	0.1715
A15-1	0.2977	0.4838	0.3236	-0.1319
A20-4	-0.1756	<b>0.5147</b>	0.3062	0.2452
A04-3	-0.1451	0.2462	0.2777	0.2681
A17-5	<b>0.6002</b>	-0.3648	0.1311	-0.1877
A17-4	<b>0.6841</b>	-0.2225	0.2627	-0.0383
A02-4	0.3359	-0.4708	-0.3044	-0.0995
A19-3	0.1915	0.1779	-0.0041	-0.2323
A17-1	0.6388	-0.3408	0.0232	-0.0710
A03-2	0.1749	0.1403	<b>0.6032</b>	-0.1286
A20-1	0.1820	0.4740	0.0584	0.3256
A02-6	<b>0.5596</b>	-0.0884	0.1510	-0.0894
A17-3	<b>0.7482</b>	-0.0640	-0.0126	-0.0955
A15-3	0.4041	0.2807	0.0474	0.0975
A19-4	<b>0.6150</b>	0.2100	-0.3616	-0.0310
A03-1	0.1824	-0.0625	0.4589	-0.1362
A20-3	0.3583	0.4780	0.0546	0.3824
A09-3	0.1924	0.2877	0.2265	0.3493
A04-5	0.1640	0.4112	0.1400	-0.4003
A15-2	<b>0.5353</b>	0.0094	-0.1321	-0.0966
A19-1	0.4633	0.4197	-0.3859	0.0277
A04-1	0.1880	<b>0.5065</b>	0.2447	-0.4235
A01-4	0.0505	-0.0494	0.2995	0.4065
A02-3	0.3416	-0.1597	0.2961	0.1722
A02-9	-0.0723	-0.4408	0.3021	0.0065
A09-2	<b>0.5114</b>	0.2294	-0.2071	0.1604
A01-1	0.3092	-0.2910	-0.0571	0.1822
A02-2	0.4689	0.2967	-0.3363	0.0734
A04-2	0.1683	0.2428	0.3786	-0.3269
A15-5	0.3024	-0.1565	0.0414	0.4308
A04-4	0.2704	-0.2030	0.0177	0.4599
A01-3	0.3463	0.1481	0.0471	0.1367
A19-5	0.0310	0.1291	-0.2301	0.4325
A20-5	0.1561	0.3169	0.2356	-0.3047
A02-5	0.2553	-0.0053	0.1583	-0.0918
A02-7	0.1688	0.0701	0.1382	0.2340
A01-5	0.0939	-0.0019	0.0433	0.1294
A09-1	-0.4093	-0.2204	0.4989	0.0216
A09-5	-0.0414	0.1305	-0.2324	0.1901
A02-8	-0.4093	-0.2204	0.4989	0.0216
A01-2	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
A04-7	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

48, 60S, 94, 42S, 85, 45, 161, 34, 70, 72, 56S, 142, 138, 78, 18S, 87, 76S, 62, 64, 104, 99, 120, 74S, 50S, 16, 32, 38, 83, 102, 90, 19S, 106, 116S, 114S, 103, 109, 49, 98, 95, 40 y 52S, donde catorce de ellos presentaron síntomas de deficiencia y treinta y tres no. En el grupo IV sólo se encuentra el genotipo 30 que no presenta síntomas. Los resultados sugieren la formación de tres grandes agrupamientos clasificado como: genotipos con síntomas (grupo I), sin síntomas (grupos I y IV) y mixto (grupo III), agrupamientos muy parecidos al obtenido con marcadores RAPD's, sin embargo, por la cantidad de genotipos mezclados con y sin síntomas ubicados en el grupo III y por el escaso número de genotipos sin síntomas presentes en los grupos II y IV, puede decirse que la utilización de datos provenientes de características morfológicas para su construcción no fue muy eficiente para lograr la separación de los genotipos con síntomas de deficiencia de aquellos que no los presentaron, como lo fueron los marcadores RAPD's. La baja eficiencia para formar grupos suficientemente definidos utilizando caracteres morfológicos, en contraste con los marcadores RAPD, puede deberse a que los primeros son fuertemente influenciados por el ambiente, por lo que no siempre son los mejores descriptores de la evolución genética y su mayor utilidad radica en que permiten explicar mejor el proceso de selección del material estudiado, mientras que los segundos no lo son y permiten trabajar directamente sobre el genotipo de la planta (Chávez, 2003; Giancola *et al.*, 2002) (Figura 4).

Estos resultados coinciden con la respuesta de las plantas en campo, donde a pesar de que los árboles se someten al mismo manejo, responden de forma diferente, posiblemente por el efecto que ejerce el pH alto en el suelo sobre la baja disponibilidad de nutrimentos como el Fe y Zn, tal como lo señaló Cakmak y Braun (2001) para el caso del Zn, donde las deficiencias de este elemento ocurren en plantas de cultivo que crecen en suelos alcalinos, ya sea por los bajos contenidos de Zn en el suelo o porque aún estando en cantidad suficiente en el mismo no está disponible para la planta. Además, el efecto del ambiente sobre los caracteres morfológicos concuerda con la fluctuación de los rendimientos de guayaba 'Media China' reportados por Mosqueda (1981); Nieto (1996); González *et al.* (1997). Esto puede estar asociado con el bajo nivel de domesticación de la planta, la influencia que ejerce el ambiente físico y por la respuesta poligénica de los caracteres morfológicos evaluados. La presencia de un reducido número de grupos formados podría interpretarse como una escasa variabilidad entre los genotipos detectada por los caracteres morfológicos, lo cual coincide con lo reportado por Padilla *et al.* (2002) quienes evaluando 12 selecciones de guayabo del tipo 'Media China' encontraron una reducida variabilidad fenotípica, pero contrario a lo observado por Hernández *et al.* (2003) quienes hallaron una amplia variabilidad fenotípica de la planta de guayabo entre y dentro de las plantaciones estudiadas. También, Perales y Silguero (1995), encontraron variabilidad en la



**FIGURA 4.** Dendrograma obtenido del análisis de 17 caracteres morfológicos de hojas de plantas de guayabo 'Media China' derivadas de semilla, con deficiencia nutricional inducida en hidroponía e invernadero, procedentes de 72 genotipos. Utilizando el coeficiente  $\chi^2$  y agrupados por el método UPGMA. La letra S delante del número de accesión denota plantas con síntomas y sin la letra S indica plantas sin síntomas de deficiencia nutricional.

forma, color epidermis y contenido de sólidos solubles totales en fruto de guayabo tipo 'Media China'. La reducida variabilidad morfológica encontrada con los agrupamientos, se establece con el análisis de los componentes principales (ACP) (Cuadro 11).

Según los datos de porcentaje acumulado del Cuadro 11, los cuatro primeros componentes principales acumulan más del 70 % de la variabilidad. Las relaciones PFV/ PFR, PFH/ PFR, PFR/ PFT y PSR/ PSV son las que mayor contribución aportan a la separación de los genotipos en el componente 1; para el componente 2 lo hacen las relaciones PSH/ PFH, PFH/ PSH y PFT/ PST; mientras que en los componentes 3 y 4 el mayor aporte lo dan PFR/ PSR, PSR/ PFR, PFT/ PFH y PFR/ PSR, PSR/ PFR y el número de hojas, respectivamente (Cuadro 12). Estos resultados apoyan la hipótesis planteada por González-Andrés (2001) en el sentido de que son las medidas relativas los caracteres

más estables y por tanto, los que más contribuyen a la diferenciación entre accesiones, porque la influencia del ambiente afecta por igual a los caracteres relacionados y su valor permanece casi invariable, lo que puede explicar el reducido número de grupos formados y la escasa variabilidad detectada. Normalmente los caracteres morfológicos son fuertemente influenciados por el ambiente y tienden a ser muy variables, es posible que el uso de medidas relativas o índices haya permitido reducir los efectos del ambiente, los resultados discordantes con otros anteriores pueden deberse a que no evaluaron las mismas variables que en esta investigación, y solo consideraron medidas absolutas y no las relativas (índices).

#### Comparación entre los patrones de marcadores RAPD y los caracteres morfológicos

La comparación entre la matriz cofenética obtenida

**CUADRO 11. Valores de Eigen-valor y varianza acumulada del análisis de componentes principales de 72 individuos obtenidos de caracteres morfológicos de hoja de guayabo 'Media China', derivados de semilla, con deficiencia nutrimental inducida bajo hidroponía e invernadero.**

Componente Principal	Eigen-valor	Porcentaje (%)	
		Individual	Acumulada
1	4.26021476	25.0601	25.0601
2	3.27849034	19.2852	44.3453
3	2.43047537	14.2969	58.6422
4	1.99216747	11.7186	70.3609
5	1.46598949	8.6235	78.9843
6	1.05101553	6.1824	85.1668
7	0.87998721	5.1764	90.3432
8	0.63466692	3.7333	94.0765
9	0.40644725	2.3909	96.4674
10	0.29793131	1.7525	98.2199
11	0.16826927	0.9898	99.2097
12	0.08347297	0.4910	99.7008
13	0.02304251	0.1355	99.8363
14	0.01419510	0.0835	99.9198
15	0.00685668	0.0403	99.9601
16	0.00459245	0.0270	99.9871
17	0.00218537	0.0129	100.00

**CUADRO 12. Valores de Eigen-vector en los primeros cuatro ejes del análisis de componentes principales de 72 individuos obtenidos de 17 caracteres morfológicos de hoja de guayabo 'Media China', con inducción a deficiencia nutrimental en hidroponía e invernadero.**

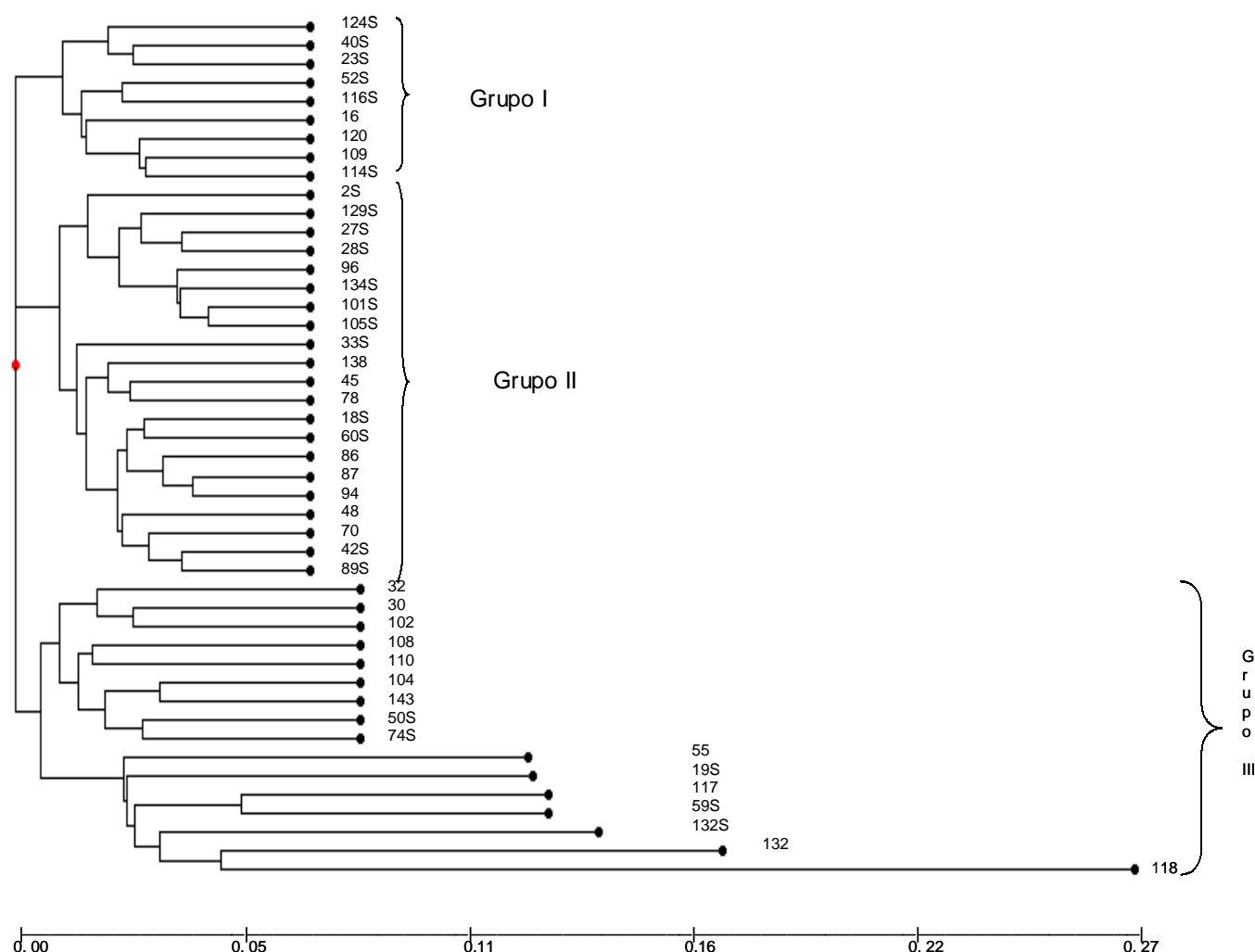
Carácter (Relaciones)	Componente Principal			
	1	2	3	4
PAP	0.4865	0.1705	0.1956	0.0877
PSR/PSV	0.8346	-0.2130	-0.1231	0.4225
PFR/PFT	0.8744	-0.0774	0.3115	0.2617
No. BROTES	-0.4628	0.1240	0.0060	0.3673
PFV/PFR	-0.9183	0.0662	-0.2017	-0.1183
PFH/PFR	-0.8847	0.1780	0.1440	0.1251
AF	-0.3175	0.4452	0.5277	0.4414
PFT/PFH	-0.0966	-0.1844	-0.7526	-0.4384
PSR/PFR	0.0601	0.1007	-0.7721	0.5914
PFR/PSR	-0.0074	-0.1311	0.7881	-0.5649
A. TOTAL	-0.1158	0.2233	-0.2548	-0.3804
PST/PFT	0.3151	0.7885	-0.0303	-0.1460
DIÁMETRO	0.2380	0.2687	-0.1920	-0.0602
PFT/PST	-0.3092	-0.7957	0.0592	0.1365
PFH/PSH	-0.1135	-0.8373	0.0694	0.1164
No. HOJAS	-0.5638	0.2983	0.1999	0.5446
PSH/PFH	0.1123	0.8485	-0.0743	-0.1365

**PAP:** peso de ápices radicales; **PSR/PSV:** peso seco de raíz/peso seco de vástago; **PFR/PFT,** peso fresco de raíz/peso fresco de tallo; **Núm. BROTES,** número de brotes **PFV/PFR:** peso fresco de vástago/peso fresco de raíz; **PFH/PFR,** peso fresco de hoja/peso fresco de raíz; **AF,** área foliar; **PFT/PFH,** peso fresco de tallo/peso fresco de hoja; **PSR/PFR,** peso seco de raíz/peso fresco de raíz; **PFR/PSR,** peso fresco de raíz/peso seco de raíz; **A. TOTAL,** altura total; **PST/PFT,** peso seco de tallo/peso fresco de tallo; **DIÁMETRO,** diámetro de tallo; **PFT/PST,** peso fresco de tallo/peso seco de tallo; **PFH/PSH,** peso fresco de hoja/peso seco de hoja; **Núm. Hojas,** número de hojas; **PSH/PFH,** peso seco de hoja/peso fresco hoja.

de datos morfológicos de 46 accesiones y la matriz de similitud producto de las mismas 46 accesiones usando marcadores RAPD's, fue no significativa estadísticamente con una  $r = 0.05743$  y una probabilidad  $P[Z < \text{observado}Z] = 0.6913$ . Lo cual coincide parcialmente con lo reportado por Giancola *et al.* (2002) quien al comparar dendrogramas generados con datos de una matriz provenientes de marcadores RAPD's y otra obtenida de caracteres morfológicos, encontró una correlación de 0.117 pero estadísticamente diferente con  $P[Z < \text{observado}Z] = 0.002$ , concluyendo, que los promedios de similitud genética entre genotipos depende del método de agrupamiento empleado, y la topología de cada árbol obtenida mediante marcadores RAPD's o a través de características morfológicas, es única y peculiar, existiendo algunas semejanzas evidentes detectadas en los dendrogramas.

Sin embargo, cuando el análisis se hizo mediante la integración de productos RAPD's o bandas y caracteres morfológicos en una sola matriz -para obtener un solo dendrograma- y el cálculo de valores se realizó utilizando el coeficiente de  $c^2$ , no se encontró separación entre genotipos con y sin síntomas, todos ellos están mezclados dentro de los tres grupos formados (Figura 5).

Analizando los caracteres RAPD's, resultó que el promedio de distancia para las bandas es de 8.09 con una varianza de 3.87, mientras que para los caracteres morfológicos el promedio es de 0.15 y la varianza de 0.4. Estos datos confirman la variabilidad detectada a través de los marcadores RAPD's y una reducida variabilidad encontrada con los caracteres morfológicos en los genotipos de guayabo 'Media China' estudiados; indican también que no siempre los cambios o mutaciones ocurridos a nivel del genoma del guayabo se corresponden con cambios a nivel del fenotipo de la planta, es decir, los primeros en su mayoría son selectivamente neutros (Giancola *et al.*, 2002; Fátima *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2001; Kimura, 1987); además, se puede señalar que aun cuando la correlación entre las matrices de disimilitud obtenidas mediante marcadores RAPD's y caracteres morfológicos fueron no significativas estadísticamente, con un valor cercano a cero, es recomendable utilizar conjuntamente métodos moleculares y morfológicos en la clasificación del material biológico, ya que en nuestro caso los RAPD's tendieron a detectar más cambios estructurales en el genoma del guayabo, como lo prueba el alto índice de polimorfismo encontrado, esta característica los sitúa como buenos descriptores de la evolución genética, mientras que el método basado en características morfológicas permite explicar mejor el proceso de selección del material estudiado y presenta la ventaja de una mayor accesibilidad. Al respecto, Giancola *et al.* (2002) encontró una estrecha similitud entre dendrogramas obtenidos con el análisis de marcadores SSR y características morfológicas para el carácter de maduración y origen ancestral de los genotipos de soya evaluados, obteniendo una correlación de 0.80 entre los dendrogramas.



**FIGURA 5.** Dendrograma construido, mediante el coeficiente  $\chi^2$  a partir de productos RAPD's y caracteres morfológicos conjuntamente procedentes de 46 genotipos de guayabo 'Media China' derivados de semilla, con deficiencia nutrimental inducida en hidroponía e invernadero. La letra S delante del número del genotipo indica plantas con síntomas y sin la letra S denota plantas sin síntomas de deficiencia nutrimental.

### CONCLUSIONES

La variabilidad de respuesta a bajas concentraciones de Fe y Zn detectada mediante marcadores RAPD's en plantas provenientes de semilla de guayabo 'Media China' es poligénica, y está asociada con la presencia de las bandas A20-4, A20-2 y A20-1.

Esta variabilidad genética puede ser producto del 30 % de alogamia que presenta la especie.

La reducida variabilidad encontrada con los caracteres morfológicos, indican que no siempre los cambios o mutaciones ocurridos a nivel del genoma del guayabo se corresponden con cambios a nivel del fenotipo de la planta.

Esta fuente de variabilidad es un potencial que debe ser utilizado en programas de mejoramiento genético en donde la ausencia de síntomas a bajas concentraciones de Fe y Zn correlacionada con la presencia de las bandas

A20-4, A20-2 y A20-1 deben ser consideradas en la selección de genotipos, al mismo nivel de algunos caracteres morfológicos como los índices PFV/ PFR, PFH/ PFR, PFR/ PFT y PSR/ PSV; debido a que son el hierro y zinc los elementos más restrictivos por el pH alcalino de los suelos donde se ubican las regiones productoras de fruta de guayaba en el país.

### LITERATURA CITADA

- BOURKE, O. D. D. 1975. *Psidium guajava* L. Guava. Commonwealth Bureau of Horticulture and Plantation Crops. New York, USA. pp. 530-553.
- CAKMAK, J.; BRAUN H, J. 2001. Genotypic variation for zinc efficiency, pp. 183-199. *In: Application of Physiology in Wheat Breeding*. REYNOLDS, M. P.; ORTIZ-MONASTERIO, J. I.; MENAB A. (eds). Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. D. F., México. 240 p.
- CHÁVEZ, J. L. 2003. Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica, pp. 72-77. *In: Análisis Estadístico de Datos*

- de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos. T. L. FRANCO Y HIDALGO, R. (eds.). Boletín técnico, Número 8. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), Cali, Colombia. 89 p.
- DE LA CRUZ, M.; RAMÍREZ, F.; HERNÁNDEZ, H. 1997. DNA isolation and amplification from cacti. *Plant Mol. Biol. Rep* 15: 319-325.
- FÁTIMA, R. C.; RUSA, P. M.; CABRAL, J. R. S. 2001. Assessment of genetic relatedness of the genera *Ananas* and *Pseudonanas* confirmed by RAPD markers. *Euphytica* 119: 245-252.
- GIANCOLA, S.; MARCUCCI, P. S.; LACAZE, P.; HOPP, M. E. 2002. Feasibility of integration of molecular markers and morphological descriptors in a real case study of a plant variety protection system for soybean. *Euphytica* 127: 95-113.
- GONZÁLEZ-ANDRÉS, F. 2001. Caracterización morfológica. pp. 199-217. *In*: Conservación y Caracterización de Recursos Fitogenéticos. GONZÁLEZ-ANDRÉS, F.; PITA-VILLAMIL, J. M. (eds.). Ed. Publicaciones I. N. E. A. Valladolid, España.
- GONZÁLEZ GAONA, E.; PADILLA-RAMÍREZ, J. S.; REYES-MURO, L.; PERALES DE LA CRUZ, M. A.; ESQUIVEL-VILLAGRANA, F. 2002. Guayaba: su cultivo en México. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural y Alimentación, INIFAP, Centro de Investigación Regional Norte Centro, Campo Experimental Pabellón; Aguascalientes, México. 182 p.
- GONZÁLEZ GAONA, E.; REYES M., L.; PADILLA R., J. S.; VALADÉZ M., C. C.; EZQUIVEL V., F.; PERALES C., M. A.; GUTIERREZ A., F. 1997. Manejo anual para la producción de guayaba en Calvillo, Ags. Folleto para productores, Número 20. INIFAP-CIRNOC-CEPAB. Pabellón, Aguascalientes, México. 14 p.
- HAMPL, V.; PAVLÍČEK, A.; FLEGR, J. 2001. Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program FreeTree: application to trichomonad parasites. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 731-735.
- HAYES, W. B. 1960. The guava and its relatives. Fruit growing in India. 3<sup>ra</sup> Edition, Kitabstan. AllaHabad, India. pp. 283-299.
- HERNÁNDEZ DELGADO, S.; MARTÍNEZ DE LARA, J.; PADILLA RAMÍREZ, J. S.; MAYER PÉREZ, N. 2003. Avances en la diversidad genética de *Psidium* sp. en la región Calvillo-Cañones, México. Programa y Resúmenes del Primer Simposio Internacional de la Guayaba. Aguascalientes, México. pp. 71-83.
- HIDALGO, R. 2003. Variabilidad genética y caracterización de especies vegetales, pp. 2-26. *In*: Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos. HIDALGO, R. (ed.). Boletín técnico, Número 8. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), Cali, Colombia. 89 p.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. 1938. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agric. Ext. Publi.* 347. pp. 35-37.
- KIMURA, M. 1987. Teoría neutralista de la evolución, pp 232-241. *In*: Genética Molecular. Libros de investigación y ciencia. Madrid, España.
- LAKSHMINARAYANA, S.; MORENO RIVERA, M. A. 1978. Estudio preliminar para determinar la existencia de las variaciones en guayaba mexicana. *Revista Chapingo*. 10: 37-46.
- LEGARIA SOLANO, J. P. 2003. Caracterización de la diversidad genética de poblaciones naturales de pitahaya (*Hylocereus undatus* Haworth. Britton and Rose) mediante marcadores RAPD's. Programa y Resúmenes del VI Congreso Nacional Agronómico. Universidad Autónoma Chapingo. pp. Chapingo, México. pp. 200-204.
- MATA BELTRAN, I.; RODRÍGUEZ MENDOZA, A. 1990. El guayabo, Aspectos de su Cultivo y Producción. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Departamento de Horticultura. Buena Vista, Saltillo, Coahuila, México. 160 p.
- MATA BELTRÁN, I.; RODRÍGUEZ MENDOZA, A. 2000. Cultivo y Producción del Guayabo. Ed. Trillas, D. F., México. 160 p.
- MOSQUEDA VÁZQUEZ, R. 1981. Logros y aportaciones de la investigación agrícola en el cultivo de frutales tropicales y subtropicales. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Instituto Nacional de Investigación Agrícola. D. F., México. pp. 46-48.
- NIETO ÁNGEL, D. 1996. Fisiología, bioquímica y patógenos en frutos de guayaba (*Psidium guajava* L.). Tesis de Doctor en Ciencias. Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. 111 p.
- PADILLA RAMÍREZ, J. S.; GONZÁLEZ GAONA, E.; ESQUIVEL VILLAGRANA, F.; MERCADO SILVA, E.; HERNÁNDEZ DELGADO, S.; MAYER PÉREZ, N. 2002. Caracterización de germoplasma sobresaliente de guayabo de la región Calvillo-Cañones, México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 25(4): 393-399.
- PENNINGTON, T. D.; SARUKAN, J. 1968. Manual para la identificación de campo de los principales árboles tropicales en México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales. D. F., México. 413 p.
- PERALES DE LA CRUZ, MA.; SILGUERO, J. F. 1995. Caracterización de colectas de guayaba, *Psidium guajava* L. de la región Calvillo-Cañones por forma y componentes del fruto. *Agricultura Técnica en México* 21(2): 195-203.
- POPENOE, W. 1974. Manual of Tropical and Subtropical Fruits: Excluding the Banana, Coconut, Pineapple, Citrus fruits, Olive and Fig. Hafner Press. New York, USA. 474 p.
- PRAKASH, D. P.; NARAYANASWAMY, P.; SONDUR SURESH, N. 2002. Analysis of molecular diversity in guava using RAPD markers. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 77(3): 287-293.
- SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. 1973. Numerical Taxonomy. Freeman. San Francisco, USA. 573 p.
- SOKAL, R. R.; SNEATH, P. H. A. 1963. Principles of Numerical Taxonomy. Freeman. San Francisco, USA. 359 p.
- THOMAS, G.; LATHA, J.; VARGHESE, G.; KALY ANARAMAN, K.; KURIACHAN, P.; DAS, M. R. 2001. Discrimination between *Oriza malampuzhaensis* Krish. et Chand. and *Oriza officinales* Wall ex Watt based on RAPD markers and morphological traits. *Euphytica* 122: 181-189.
- TONG, F.; MEDINA, D.; ESPARZA, D. 1991. Variabilidad en poblaciones de guayaba (*Psidium guajava* L.) del municipio de Mara del Estado de Zulia. *Revista de Agronomía de la Universidad de Zulia* 8(1): 15-27.
- WEBER, C. A. 2003. Genetic diversity in black raspberry detected by RAPD markers. *HortScience* 38(2): 269-272.